



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/82, 15/12, 1/21, A01H 5/00 | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 98/38323 (43) Date de publication internationale: 3 septembre 1998 (03.09.98) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00381 (22) Date de dépôt international: 26 février 1998 (26.02.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/02369 27 février 1997 (27.02.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOCEM [FR/FR]; 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PEREZ, Pascual [FR/FR]; Chemin de la Pradelle, Varennes, F-63450 Chanonat (FR). FLAMENT, Pascal [FR/FR]; 7, impasse du Moulin, F-63118 Cebazat (FR). (74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR). | | (81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> |
| (54) Title: NOVEL USES OF MALE STERILITY IN PLANTS (54) Titre: NOUVELLES UTILISATIONS DE LA STERILITE MALE CHEZ LES PLANTES (57) Abstract The invention concerns novel uses of male sterility to improve the cultivation conditions of transgenic plants for man and environment. (57) Abrégé L'invention concerne de nouvelles utilisations de la stérilité mâle pour améliorer les conditions de culture des plantes transgéniques pour l'homme et l'environnement. | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

Nouvelles utilisations de la stérilité mâle chez les plantes

L'invention concerne de nouvelles utilisations de la stérilité mâle pour limiter les risques liés à la production de plantes transgéniques pour l'homme et l'environnement.

Les bénéfices de l'utilisation de plantes transgéniques sont très prometteurs. La transgénèse de gènes de mammifères dans une
5 cellule végétale offre en particulier une voie de production en grandes quantités de protéines recombinantes nouvelles, à un coût de production réduit et sans risque de contaminations virales ou subvirales (prions).

Cependant, ces bénéfices ne doivent pas faire oublier les
10 aspects de nature écologique liés à la production de plantes transgéniques, auxquels le public est très sensible.

La Demanderesse a présentement mis au point une technologie mettant la stérilité mâle au service d'une "biotechnologie verte", respectueuse des aspects écologiques et humains.

15 Une amélioration possible réside dans le contrôle de la dissémination du transgène dans l'environnement.

L'isolation spatiale des parcelles cultivées permet déjà de réduire le risque de "fuites" du transgène mais cette méthode est contraignante et devient problématique avec la multiplication des
20 produits.

L'intérêt de méthodes génétiques pour isoler le transgène et réduire le risque de "fuite" a été suggéré dans un article d'Ellstrand en 1990. Parmi de nombreuses propositions de solutions face au problème de "fuite" du transgène, Ellstrand note que des génotypes mâle stérile
25 pourraient être introduits, ou qu'un gène létal pour le pollen pourrait être lié directement à un gène construit par génie génétique. Cependant, aucun développement technique n'avait été mis en oeuvre dans ce sens. Or, il était impossible de prévoir le succès de la mise en oeuvre d'un tel développement, en raison notamment du nombre de paramètres mis en
30 jeu dans les techniques de génie génétique chez les plantes.

Or, il était impossible de prévoir le succès de la mise en oeuvre d'un tel développement, en raison notamment du nombre de paramètres mis en jeu dans les techniques de génie génétique chez les plantes.

La Demanderesse a mis au point une technologie
5 permettant d'empêcher la dissémination du transgène par voie pollinique et donc sa "fuite" dans l'environnement, technologie selon laquelle une plante mâle stérile est utilisée pour éviter la dissémination d'un transgène d'intérêt intégré dans le génome de ladite plante.

L'intérêt du contrôle de la fertilité mâle est connu pour la
10 production de plantes hybrides qui implique le croisement de deux lignées différentes.

Une des méthodes pour empêcher l'auto-fécondation en contrôlant la pollinisation est la "castration" manuelle des organes mâles de la plante.

15 Des recherches sont également menées pour un contrôle génétique du développement du pollen.

La stérilité mâle peut être "acquise", c'est-à-dire qu'elle est indépendante d'une quelconque manipulation génétique par la voie de l'ADN recombinant. On peut distinguer la stérilité mâle cytoplasmique de
20 la stérilité mâle nucléaire (Williams, 1995). La stérilité mâle cytoplasmique est liée à des changements dans l'organisation et l'expression du génome mitochondrial, la stérilité mâle nucléaire résulte de mutations dans le génome du noyau de la cellule.

La stérilité mâle peut aussi être "artificielle", c'est-à-dire
25 qu'elle est induite par l'expression d'un gène conférant la stérilité mâle (gène AMS) qui est inséré soit dans le génome mitochondrial (stérilité

mâle cytoplasmique), soit dans le génome nucléaire (stérilité mâle nucléaire).

Conformément à l'invention, ladite plante mâle stérile utilisée pour éviter la dissémination d'un transgène d'intérêt intégré dans le génome de ladite plante est porteuse :

- soit d'une stérilité mâle cytoplasmique, de préférence une stérilité mâle artificielle induite par un transgène intégré dans le génome mitochondrial de ladite plante ;

- soit d'une stérilité mâle nucléaire, de préférence une stérilité mâle induite par un transgène inséré dans un site non essentiel du génome nucléaire de ladite plante.

De manière préférentielle, conformément à l'invention, ladite plante peut avoir été rendue mâle stérile par l'insertion, dans un site non essentiel du génome nucléaire, d'une séquence comprenant un gène AMS et ledit transgène d'intérêt génétiquement liés.

La liaison entre le gène d'intérêt et le gène de l'AMS aura pour effet d'interdire sa dissémination par voie pollinique, permettant ainsi une multitude de productions différentes dans un même environnement.

En outre, le transfert du gène de l'AMS lui-même vers les plantes de type sauvage n'est pas à craindre car il ne sera pas susceptible d'être retenu au sein d'une population sauvage dans la mesure où il représente plus un "fardeau génétique" qu'un quelconque avantage sélectif.

Par liaison entre gène d'intérêt et gène de l'AMS, on entend une distance génétique suffisamment faible pour que les fréquences de recombinaison au cours de la méiose soient négligeables.

Par transformation génétique, on peut introduire dans une plante deux voire trois gènes dont la liaison physique est absolue.

L'invention a également pour objet une plante transgénique, partie ou extrait de plante transgénique, caractérisée en ce que ledit
5 transgène d'intérêt est lié génétiquement à un gène AMS associé à des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.

Conformément à la présente invention, il est entendu que la présence dudit gène AMS n'empêche pas l'expression dudit transgène
10 d'intérêt.

Par "partie" de plante transgénique, on entend notamment feuilles, fruits, ou cellules de plantes transformées génétiquement.

L'invention a également pour objet un vecteur, notamment plasmide, caractérisé en ce qu'il contient un transgène d'intérêt associé à
15 des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription, lié génétiquement à un gène AMS associé à des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la stérilité mâle artificielle peut être conférée par un gène constitué d'une séquence codant une protéine susceptible de dégrader les ARN
20 cellulaires (RNase) sous contrôle d'un promoteur anthère spécifique tels que décrit par PAUL W. et al. (1992).

Cette RNase peut être la Barnase de *Bacillus amyloliquefaciens*. Le promoteur peut avantageusement être le promoteur
25 A9 d'*Arabidopsis thaliana* spécifique du tapis de l'anthère.

Les plantes exprimant ce gène chimérique deviennent incapables de produire un pollen viable grâce à la destruction spécifique des cellules du tapis de l'anthere. De telles plantes sont par ailleurs normales.

5 Les plantes selon l'invention étant incapables de produire du pollen viable, il n'y a aucun risque de dissémination des gènes de stérilité mâle et d'intérêt par le pollen.

La multiplication de ces plantes se fait en apportant du pollen provenant de plantes non porteuses du gène d'intérêt selon
10 l'invention.

Dans le cas du maïs, la culture des plantes transgéniques en vue de la production peut être assurée selon un schéma de type production de semences (4 ou 6 lignes femelles suivies de 2 lignes pollinisatrices). Les plantes utilisées comme femelles (plantes porteuses
15 du gène d'intérêt) sont semées en double densité. Dans un tel schéma, le gène d'intérêt est lié à un gène de sélection (par exemple, gène conférant une résistance à un herbicide), ce qui permet ensuite, par un traitement avec l'agent de sélection (herbicide par exemple), d'éliminer les plantes autres que mâles stériles. La récolte ne se fait alors que sur les lignes
20 femelles.

Pour la production finale, un semis en mélange peut également être envisagé. Dans ce cas, la lignée pollinisatrice est non porteuse du gène d'intérêt et est utilisée en mélange (10 %) avec la
25 lignée utilisée comme femelle. Le semis est réalisé en double densité. Le champ est dans ce cas récolté dans son intégralité.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on utilise la stérilité mâle cytoplasmique pour limiter la dissémination d'un transgène intégré dans le génome d'une plante.

5 Les plantes porteuses d'une stérilité mâle cytoplasmique sont affectées dans leur génome mitochondrial, ce qui les rend inaptes à la production de pollen en absence des gènes nucléaires de restauration. Cette stérilité mâle peut être soit "acquise", soit provoquée artificiellement par l'insertion dans le génome mitochondrial d'un gène conférant la stérilité mâle cytoplasmique (gène CMS), par exemple le gène Ogura.

10 De telles plantes sont habituellement utilisées par les établissements semenciers pour faciliter leur production de semences. Une part importante de la production de semences de maïs repose, par exemple, en Europe, sur l'utilisation d'une stérilité mâle cytoplasmique dite de type C.

15 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, on introduit un transgène par rétrocroisement dans une lignée de plante, notamment de maïs, porteuse d'une stérilité mâle cytoplasmique. La plante mâle stérile est dans ce cas utilisée comme parent femelle. Deux rétrocroisements successifs suivis d'évaluations et sélections dans la descendance permettent d'atteindre l'état homozygote pour ce transgène.

20 En absence de gène nucléaire de restauration (gène Rf4 pour le cytoplasme C), la plante porteuse du transgène sera donc rendue mâle stérile. Aucun grain de pollen porteur d'un transgène ne sera donc émis dans l'environnement. Si la plante est homozygote pour le transgène, tous les grains récoltés sont porteurs du gène et donc expriment le phénotype.

25

La culture de ces plantes en vue de la production est réalisée en cultivant des plantes pollinisatrices à proximité des plantes transgéniques mâles stériles. Ceci peut être obtenu soit par mélange de semences (10 % de pollinisateur sont suffisants), soit par une alternance
5 de lignes femelles (mâles stériles) et de lignes pollinisatrices. Dans ce dernier cas, seules les femelles sont récoltées.

L'invention a également pour objet un procédé de production d'un produit d'expression d'un transgène d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend :

10 a) - soit la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire tel que défini précédemment, lui-même transformé par un vecteur contenant un transgène d'intérêt associé à des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, lié génétiquement à un gène AMS associé à des éléments permettant son
15 expression dans les cellules végétales, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules un gène AMS lié génétiquement à un transgène d'intérêt ;

- soit la transformation de cellules végétales porteuses d'une stérilité mâle cytoplasmique ou nucléaire de manière à intégrer un
20 transgène d'intérêt dans le génome de ces cellules ;

b) la régénération de plantes transformées à partir des cellules végétales transformées sus-mentionnées ;

c) la récupération du produit d'expression dudit transgène d'intérêt dans lesdites cellules ou plantes transformées sus-mentionnées,
25 notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

Un autre aspect lié à la production de plantes transgéniques réside dans la présence de gènes éventuellement jugés indésirables,

voire néfastes, pour l'homme et/ou l'environnement, en particulier aux yeux du public.

En effet, pour obtenir des plantes transgéniques, il faut trier parmi des millions de cellules, celles comportant la modification à introduire. Pour ce faire, on utilise des gènes dits marqueurs qui confèrent habituellement des résistances à des antibiotiques ou à des herbicides. Ces gènes sont parfois jugés indésirables et différentes stratégies (co-transformation, utilisation de recombinases...) ont été envisagées pour tenter de les éliminer.

Ainsi, la demande de brevet WO 92 01370 divulgue un procédé pour produire une plante transgénique contenant un gène d'intérêt, libérée de gènes marqueurs utilisant un système de transposition.

Par ailleurs, la demande WO 91 09957 divulgue un procédé de recombinaison site-spécifique dans des cellules de plantes qui utilise un système Cre/lox pour produire une délétion, une insertion ou un échange réciproque de segments d'ADN. Le procédé décrit est applicable à l'élimination d'un gène marqueur. Le déposant cite aussi l'utilisation de ce procédé pour restaurer la fertilité dans le cadre de la production de semences hybrides par génie génétique.

Cependant, dans l'art antérieur, la stérilité mâle n'avait pas été utilisée comme marqueur en tant que tel dans des opérations de criblage.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le gène AMS peut servir de marqueur positif pour le criblage de plantes ayant intégré un transgène d'intérêt, les individus possédant ledit gène AMS étant sélectionnés.

La présence de ce gène AMS peut être détectée notamment par des analyses moléculaires utilisant des réactions de polymérisation en chaîne (PCR), et/ou par des analyses de Southern blot selon des techniques usuelles (Sambrook et al., 1989). Les plantes possédant une
5 stérilité mâle peuvent aussi être tout simplement sélectionnées en observant la présence ou l'absence de développement des grains de pollen. Le gène AMS ayant servi de marqueur positif peut ensuite être considéré comme indésirable et peut être excisé.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le gène
10 AMS permet l'amélioration du procédé d'élimination d'un fragment d'ADN exogène indésirable dans le cadre d'opérations de criblage de plantes transformées génétiquement.

En effet, pour être efficaces, les stratégies de criblage existantes, reposant sur l'utilisation d'un gène marqueur, telles que
15 décrites dans les demandes de brevet précitées par exemple, doivent fonctionner à une fréquence très élevée. Les cellules ou plantes ayant perdu le gène marqueur ne sont plus sélectionnables par rapport à celles dont elles sont issues. Le tri repose alors sur des méthodes moléculaires lourdes et onéreuses.

La Demanderesse a présentement découvert l'intérêt de
20 l'utilisation d'un gène conférant la stérilité mâle artificielle (gène AMS) comme "marqueur suicide" ou "négatif" d'un événement d'excision, à savoir que seuls les individus qui l'auront perdu se multiplient. Ceci permet l'utilisation de stratégies d'élimination d'un fragment d'ADN
25 exogène indésirable ayant des rendements faibles et donc l'élargissement des champs d'investigation dans ce domaine.

Conformément à l'invention, le gène AMS est lié génétiquement à un fragment d'ADN indésirable de telle sorte que ledit gène AMS et ledit fragment d'ADN indésirable puissent être excisés simultanément.

5 Ledit fragment d'ADN exogène indésirable peut être notamment un gène marqueur, de préférence un gène conférant une résistance à un antibiotique.

Les systèmes d'élimination de gènes indésirables reposent généralement sur deux composants: un fragment d'ADN excisable qui
10 contient le gène indésirable et un inducteur de cette excision.

Selon un mode de réalisation de l'invention, on introduit dans le fragment excisable un gène conférant la stérilité mâle artificielle. Les plantes transformées avec ce premier composant seront donc mâles stériles, et maintenues par rétrocroisement ("back-cross"). L'inducteur
15 apporté par un croisement, entraînera l'élimination du fragment d'ADN contenant le gène AMS, provoquant ainsi le développement de fruits issus d'autofécondation. Ces fruits contiennent des individus débarrassés du gène AMS et de gène indésirable.

En pratique, il suffit de recueillir les seules graines produites en autofécondation par des plantes F1 contenant les deux composants.
20

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la plante ayant intégré le fragment d'ADN excisable contenant le gène AMS peut être transformée par un fragment d'ADN inducteur de l'excision.

Le système d'excision utilisé conformément à l'invention pour éliminer le fragment d'ADN indésirable peut être un système de
25 transposition, tel que notamment le système Ac/Ds du maïs, ou un système de recombinaison, tel que notamment le système Cre/lox du

bactériophage P1, le système FLP/FRT de la levure, la recombinaise Gin du phage Mu, la recombinaise Pin de *E. coli* ou le système R/RS du plasmide pSR1.

Un but de la présente invention est également de fournir un
5 vecteur, notamment plasmide, caractérisé en ce qu'il comporte un fragment d'ADN excisable qui comprend un fragment d'ADN indésirable et ledit gène AMS, ledit fragment d'ADN indésirable étant de préférence un gène marqueur, de préférence un gène conférant une résistance à un antibiotique, ledit gène AMS et ledit fragment d'ADN indésirable étant
10 associés chacun respectivement à des éléments permettant leur expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.

Lesdits vecteurs selon l'invention sont utilisés pour la transformation de cellules végétales.

15 L'invention a enfin pour objet un kit pour la mise en oeuvre du procédé d'élimination d'un fragment excisable, caractérisé en ce qu'il contient d'une part un vecteur tel que défini précédemment, contenant un transgène d'intérêt associé à des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, lié génétiquement à un gène AMS associé à
20 des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, comprenant un gène AMS excisable, ou une plante ou partie de plante transformée par ledit vecteur, et d'autre part un vecteur portant une source de transposase ou de recombinaise, ou une plante ou partie de plante transformée par ledit vecteur.

25 La transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert des vecteurs susmentionnés dans les protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de

polyéthylèneglycol (PG) en présence de cations divalents (Ca^{2+}) selon la méthode décrite dans l'article de Krens et al., 1982.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm et al., 1986.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Sanford, (1988).

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon les méthodes décrites dans les articles de Bevan, 1984 et d'An et al., 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin et al., 1987.

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al.).

Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

Le gène AMS et le gène d'intérêt peuvent être associés ensemble ou chacun respectivement à un système de contrôle transcriptionnel, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.

Le gène AMS peut être notamment associé à un système de contrôle transcriptionnel comprenant un promoteur permettant une expression spécifique dans l'anthere tel que le promoteur A3 ou A9 (WO 92 11379) ou les promoteurs TA29, TA26 ou TA13 (WO 89 10396).

Parmi les terminateurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de Franck et al., (1980), ou le terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

Parmi les promoteurs de transcription pouvant être utilisés, par exemple en association avec le gène d'intérêt, on peut citer notamment :

- le promoteur 35S, ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV, décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;

5 - le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant l'expression des polypeptides recombinants de l'invention uniquement dans les semences (ou graines) de la plante obtenue à partir de cellules transformées selon l'invention, et décrit dans l'article de Depigny-This et al., 1992 ;

10 - les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993) et permettant une expression spécifique dans les graines ;

15 - le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M et al., 1995), constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;

20 - le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1991 ;

- le promoteur HMGW (High Molecular Weight Glutenine) d'orge (Anderson O.D. et al., 1989) ;

25 - le promoteur du gène de γ zéine de maïs (Pyzéine) contenu dans le plasmide py63 décrit dans Reina et al., 1990, et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs.

Avantageusement, le gène de la stérilité mâle et le gène d'intérêt sont associés à une ou plusieurs séquences codant pour un peptide responsable de l'adressage des polypeptides recombinants dans un compartiment déterminé de la cellule végétale, notamment dans le
5 réticulum endoplasmique ou dans les vacuoles, ou bien même à l'extérieur de la cellule, dans la paroi pectocellulosique ou dans l'espace extracellulaire aussi appelé apoplasme.

Ces séquences codant pour un peptide d'adressage peuvent être d'origine végétale, humaine ou animale.

10 Parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage d'origine végétale, on peut citer :

- la séquence nucléotidique de 69 nucléotides (indiqués dans les exemples ci-dessous) codant pour le prépeptide (peptide signal) de 23 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, ce peptide
15 signal permettant l'entrée des polypeptides recombinants de l'invention dans le système de sécrétion des cellules végétales transformées selon l'invention (à savoir principalement dans le réticulum endoplasmique) ;

- la séquence nucléotidique de 42 nucléotides (indiquée dans les exemples ci-dessous) codant pour le propeptide N-terminal
20 d'adressage vacuolaire de 14 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, permettant l'accumulation des polypeptides recombinants de l'invention dans les vacuoles des cellules végétales transformées selon l'invention ;

- la séquence nucléotidique de 111 nucléotides (indiquée dans les exemples ci-dessous) codant pour le prépropeptide de 37 acides
25 aminés de la sporamine A constitué de la partie N-terminale vers la partie C-terminale des 23 acides aminés du peptide signal susmentionné suivis

par les 14 acides aminés du propeptide susmentionné, ce prépropeptide permettant l'entrée des polypeptides recombinants de l'invention dans le système de sécrétion et leur accumulation dans les vacuoles des cellules végétales transformées selon l'invention ;

5 les trois séquences susmentionnées étant décrites dans les articles de Murakami et al., 1986 et Matsuoka et al., 1991 ;

- le propeptide carboxyterminal de la lectine d'orge décrit notamment dans les articles de Schroeder et al., 1993 et de Bednarek et al., 1991 ;

10 - et le PRS (Pathogenesis Related Protein, Cornelissen et al., 1986) permettant la sécrétion.

On peut également citer parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage, celle codant pour les peptides KDEL, SEKDEL et HDEL à l'extrémité C-terminale et permettant un adressage dans le

15 réticulum endoplasmique.

Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées conformément à la présente invention, on peut citer celles du colza, tabac, maïs, pois, tomate, carotte, blé, orge, pomme de terre, soja, tournesol, laitue, riz et luzerne.

20 Les gènes d'intérêt à intégrer dans le génome de la cellule végétale peuvent être notamment des gènes codant pour des protéines d'origine humaine ou animale pouvant présenter un intérêt thérapeutique ou prophylactique, telles que le collagène, la lipase gastrique, etc.

Les gènes marqueurs utilisés peuvent être notamment des

25 gènes conférant une résistance à des antibiotiques tels que l'hygromycine, la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine ou à des herbicides tels que le glufosinate, le glyphosate ou le bromoxynil.

EXEMPLES

La construction des différents plasmides ainsi que leur
ligation et la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 α rendues
5 préalablement compétentes, est réalisée grâce aux techniques usuelles
d'ADN recombinant (Sambrook et al., 1989).

EXEMPLE 1

**Construction d'un plasmide binaire associant la stérilité
mâle conférée par le gène codant la PR-glucanase, la production de
la lipase gastrique de chien, la sélection sur kanamycine et la
15 sélection sur basta, utilisable en transgénèse du colza.**

Le plasmide "binaire" dérivé de pGA492 (An, 1986) qui
contient entre les bordures droite et gauche; issues du plasmide pTiT37
d'*Agrobacterium tumefaciens*, sur son ADN de transfert, les séquences
20 suivantes : le promoteur constitutif du gène nos codant pour la nopaline
synthase (Depicker et al., 1982), la séquence codante du gène NPTII
codant pour la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la
kanamycine (Berg et Berg, 1983) déléetée de la région des 8 premiers
codons dont le codon initiateur méthionine ATG et fusionnée à la
25 séquence des 14 premiers codons de la séquence codante du gène nos
(Depicker et al., 1982), la séquence codante du gène nos dépourvue de
la région des 14 premiers codons, le terminateur nos (Depicker et al.,

1982), une région contenant des sites multiples de clonage (encore désignée polylinker) (HindIII-XbaI-SacI-HpaI-KpnI-ClaI-BglII) précédant le gène CAT codant pour la chloramphénicol acétyltransférase (Close et Rodriguez, 1982) et les séquences terminatrices du gène 6 du plasmide pTiA6 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Liu et al., 1993).

a) Construction du plasmide pBIOC500 portant le gène conférant la stérilité mâle.

Le gène chimérique correspondant à "promoteur A9-PR-glucanase-T35S" contenu dans pDW80PR (Worall et al., 1992) a été utilisé. Le fragment KpnI-EcoRV portant ce gène chimérique a été isolé par double digestion enzymatique par KpnI et EcoRV, purifié par électroélution après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0,8%, précipité à l'alcool, séché. Il a été inséré aux sites KpnI et SmaI du plasmide pBluescript KS+ commercialisé par Stratagene. La ligation a été réalisée avec 100 ng du plasmide déphosphorylé et de 50 ng de fragments KpnI-EcoRV dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 50 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. A partir du plasmide obtenu, le fragment KpnI - SstI portant le gène chimérique décrit ci-dessus a été introduit aux sites KpnI et SstI de pGA492. L'isolement du fragment chimérique est réalisée avec les procédés usuels. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur

déphosphorylé et de 50 ng de fragments portant le fragment KpnI-SstI dans un milieu réactionnel de 10 ml en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 12 µg/ml de tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le vecteur obtenu est appelé pBIOC500.

b) Construction du plasmide pBIOC501 portant le gène conférant la résistance au Basta.

Le fragment EcoRI - HindIII portant le gène chimérique "P35S - pat- TNOS", isolé à partir du plasmide pIB16.1 (Broer et al., 1988), a été inséré aux sites EcoRI et HindIII de pBSISK+ commercialisé par Strategene et modifié par l'ajout d'un site KpnI dans le site SmaI de la séquence polylinker de pBSISK+. Le plasmide résultant est appelé pBIOC501. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 50 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

c) Construction du plasmide pBIOC502 portant le gène codant pour la lipase gastrique de chien.

Le gène chimérique correspondant à "PCR-PSLGL-LGC - T35S" isolé à partir de pBIOC93 décrit dans la demande WO 9633277, est porté par le fragment obtenu par double digestion SacI et XhoI, le site

Sacl étant réparé par l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Ce fragment a été inséré entre le site Apal traité par l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase et le site XhoI du plasmide pBIOC501. Le plasmide résultant est appelé pBIOC502. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 50 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

d) Construction du vecteur binaire pBIOC503.

A partir de pBIOC502, un fragment KpnI portant les cassettes d'expression, "PCRU-PSLGL-LGC-T35S" et "P35S - pat - TNOS", a été isolé et ligué au site KpnI de pBIOC500. Le plasmide résultant est appelé pBIOC503. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 12 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

L'ADN plasmidique du plasmide pBIOC503 a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters et al. (1978).

EXEMPLE 2

5 **Construction d'un plasmide binaire associant la stérilité mâle conférée par le gène codant pour la barnase, la production de la lipase gastrique de chien, la sélection sur kanamycine et la sélection sur basta, utilisable en transgénèse du colza.**

10 **a) Construction du plasmide pBIOC504 portant le gène conférant la stérilité mâle.**

 Le gène chimérique correspondant à "promoteur A9 barnase - T35S" contenu dans pWP173 (Paul et al., 1992) a été utilisé. Le fragment KpnI - EcoRV portant ce gène chimérique a été inséré aux sites KpnI et SmaI du plasmide pBluescript KS+ commercialisé par Strategene. A partir du plasmide obtenu, le fragment KpnI - SstI portant le
15 gène chimérique décrit ci-dessus a été introduit aux sites KpnI et SstI de pGA492. Le vecteur obtenu est appelé pBIOC504. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 50 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé
20 par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

b) Construction du plasmide pBIOC501 portant le gène conférant la résistance au Basta.

 Le vecteur a été construit comme décrit dans l'exemple 1 b).
25

c) Construction du plasmide pBIOC502 portant le gène codant pour la lipase gastrique de chien.

Le vecteur pBIOC502 a été construit comme décrit dans l'exemple 1 c).

5

d) Construction du vecteur pBIOC505.

A partir de pBIOC502, un fragment KpnI portant les cassettes d'expression, "PCRU-PSLGL-LGC-T35S" et "P35S - pat - TNOS", a été isolé et ligué au site KpnI de pBIOC504. Le plasmide résultant est appelé pBIOC505. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 50 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

10

15

L'ADN plasmidique du plasmide pBIOC505 a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters et al. (1978).

EXEMPLE 3

20

Obtention de plants de colza transgéniques

25

Les graines de colza de printemps (*Brassica napus* cv WESTAR ou lignées Limagrain) sont désinfectées pendant 40 minutes dans une solution de Domestos à 15 %. Après quatre rinçages à l'eau stérile, les graines sont mises à germer, à raison de 20 graines par pot de 7 cm de diamètre et 10 cm de haut, sur du milieu minéral de Murashige et Skoog (Sigma M 5519) avec 30 g/l de saccharose et solidifié avec du gel

Agar à 5 g/l. Ces pots sont placés dans une chambre de culture à 26°C avec une photopériode de 16H/8H et sous une intensité lumineuse de l'ordre de 80 $\mu\text{E. m}^{-2} \text{ S}^{-1}$.

5 Après cinq jours de germination, les cotylédons sont prélevés stérilement en coupant chaque pétiole environ 1 mm au-dessus du noeud cotylédonaire.

 Parallèlement, une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404, contenant les plasmides binaires, est réalisée en Erlenmeyer de 50 ml, pendant 36 heures à 28°C dans 10 ml de milieu bactérien 2YT (Sambrook et al., 1989) complémenté avec les
10 antibiotiques utiles à la sélection de la souche utilisée.

 Cette préculture sert à ensemercer à 1 % une nouvelle culture bactérienne effectuée dans les mêmes conditions. Au bout de 14 heures, la culture est centrifugée 15 minutes à 3 000 g et les bactéries
15 sont reprises dans un volume équivalent de milieu de germination liquide. Cette suspension est distribuée dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre à raison de 5 ml/boîte.

 L'extrémité sectionnée du pétiole est immergée quelques secondes dans la solution d'agrobactéries ainsi préparées, puis le pétiole
20 est enfoncé de quelques millimètres dans le milieu de régénération. Ce milieu a la même composition de base que le milieu de germination avec en plus 4 mg/l de benzyl-amino-purine (BAP), phytohormone favorisant la néoformation de bourgeons. Dix explants (cotylédon avec pétiole) sont mis en culture par boîte de Pétri de 9 cm de diamètre (Greiner référence
25 664102).

 Après deux jours de coculture dans les mêmes conditions environnementales que les germinations, les explants sont repiqués dans

des boîtes phytatray (Sigma, référence P1552) contenant le milieu précédent complémenté avec un agent sélectif : 45 mg/l de sulfate de kanamycine (Sigma, référence K 4000) et un bactériostatique : mélange de 1/6 en poids de sel de potassium d'acide clavulanique et de 5/6 sel de sodium d'amoxicilline (Augmentin® injectable) à raison de 600 mg/l.

Deux fois de suite, à trois semaines d'intervalle, les explants sont repiqués stérilement sur du milieu neuf dans les mêmes conditions.

Les bourgeons verts apparus à la fin du deuxième ou du troisième repiquage sont séparés de l'explant et mis en culture individuellement dans des pots transparents de 5 cm de diamètre et de 10 cm de haut contenant un milieu identique au précédent mais dépourvu de BAP. Après trois semaines de culture, la tige du bourgeon transformé est sectionnée et le bourgeon est repiqué dans un pot de milieu frais. Au bout de trois à quatre semaines, les racines sont assez développées pour permettre l'acclimatation de la plantule dans un phytotron. Les bourgeons qui ne sont pas verts ou enracinés sont éliminés. Ces plantules sont alors transplantées dans des godets de 7 cm de côté remplis de terreau (norme NF U44551 : 40 % de tourbe brune, 30 % de bruyère tamisée et 30 % de sable) saturé en eau. Après deux semaines d'acclimatation en phytotron (température : 21°C ; photopériode : 16H/8H et 84 % d'humidité relative), les plantules sont repotées dans des pots de 12 cm de diamètre remplis du même terreau enrichi en engrais retard (Osmocote, à raison de 4 g/l de terreau) puis transportées en serre (classe S2) régulée à 18°C avec deux arrosages quotidiens de deux minutes à l'eau.

Dès l'apparition de fleurs, celles-ci sont ensachées (Crispac, référence SM 570y 300 mm*700 mm) de façon à empêcher la fécondation croisée.

Lorsque les siliques sont arrivées à maturité, elles sont récoltées, séchées puis battues. Les graines obtenues servent au dosage de l'activité biochimique du gène d'intérêt.

5 La sélection de la descendance transgénique se fait par germination sur un milieu contenant du sulfate de kanamycine à raison de 100 à 150 mg/l (selon les génotypes). Les conditions opératoires sont identiques à celles décrites ci-dessus, à ceci près que les germinations sont effectuées en tubes de verre avec une seule graine par tube. Seules les plantules développant des racines secondaires les trois premières
10 semaines, sont acclimatées en phytotron avant d'être passés en serre.

EXEMPLE 4

Obtention de plantes de tabac transgéniques

15 Les plants de tabac utilisés pour les expériences de transformation (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* NC et PBD6) sont cultivés *in vitro* sur le milieu de base de Murashige et Skoog (1962) additionné des vitamines de Gamborg et al (1968), Sigma référence M0404), de
20 saccharose à 20 g/l et d'agar (Merck) à 8 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avec une solution de potasse avant autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Les plantules de tabac sont repiquées par bouture des entre-
noeuds tous les 30 jours sur ce milieu de multiplication MS20.

Toutes les cultures *in vitro* sont réalisées en enceinte
25 climatisée, dans les conditions définies ci-dessous :

- intensité lumineuse de 30 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$, photopériode de 16 heures ;

- thermopériode de 26°C le jour, 24°C la nuit.

La technique de transformation utilisée est dérivée de celle de Horsch et al. (1985).

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche
5 LBA4404 contenant les plasmides binaires est réalisée durant 48 heures à 28°C sous agitation, dans du milieu LB (Sambrook et al., 1989) additionné des antibiotiques adéquats (kanamycine). La préculture est ensuite diluée au 1/50 dans le même milieu et cultivée dans les mêmes conditions. Après une nuit, la culture est centrifugée (10 minutes, 3 000
10 g), les bactéries sont reprises dans un volume équivalent de milieu MS30 (30 g/l saccharose) liquide et cette suspension est diluée au 1/10.

Des explants d'environ 1 cm² sont découpés à partir de feuilles de plantules décrites ci-dessus. Ils sont ensuite mis en contact de la suspension bactérienne pendant une heure, puis séchés rapidement
15 sur papier filtre et placés sur un milieu de coculture (MS30 solide).

Après deux jours, les explants sont transférés en boîtes de Pétri sur le milieu de régénération MS30, contenant un agent sélectif, la kanamycine (2 000 mg/l), un bactériostatique, l'Augmentin® (400 mg/l) et les hormones nécessaires à l'induction de bourgeons (BAP, 1 mg/l et
20 ANA, 0,1 mg/l). Un repiquage des explants est effectué sur le même milieu après deux semaines de culture. Après deux semaines supplémentaires, les bourgeons sont repiqués en boîtes de Pétri sur le milieu de développement composé du milieu MS20 additionné de kanamycine et d'Augmentin. Après quinze jours, les bourgeons sont
25 repiqués de moitié. L'enracinement prend environ 20 jours, au terme duquel les plantules peuvent être clonées par bouture d'entre-nœuds ou sorties en serre.

EXEMPLE 5

Construction d'une source de transposase.

5 On a construit un plasmide binaire portant une source de transposase fixée sous le promoteur 35S, puisqu'il s'est avéré conduire une expression forte et précoce de cette transposase (Finnegan et al., 1993).

10 Pour ce faire, le fragment BamHI-EcoRI de pBI35S Ac (construit par Finnegan) a été cloné aux sites BamHI et SnaBI de pBI121 (Jefferson et al., 1987)). Le plasmide résultant nommé pBIOS144 contient, entre les bordures droite et gauche, le gène de résistance à la kanamycine NPTII sous promoteur et terminateur nos. L'élément Ac délété de sa partie 5' sous le promoteur 35S, constituant ainsi la source
15 de transposase fixée, et 1400 paires de bases de la partie 5' du gène codant pour la β -glucuronidase d'*E. coli* (gène GUS noté *del GUS* sur la figure 3) suivi du terminateur nos.

20

EXEMPLE 6

Construction de l'élément Ds : Kana^R-AMS.

 Les étapes successives ayant conduit à la fabrication de ce vecteur sont les suivantes :

25

a) Construction du plasmide pBIOC203 portant le gène conférant la résistance à la kanamycine.

On a inséré le fragment BamHI de 1 Kb (correspondant au gène NPTII) de pCamVNEO (Fromm et al., 1986) au site BamHI de pBIOS1 (Perez et al., 1989). Le vecteur pBIOS 1K résultant a été digéré par EcoRI. Le fragment EcoRI de BIOS 1K a été rendu franc par la polymérase Klenow, puis cloné dans le plasmide AF 3'Ac (Cocherel et al., 1996) au site EcoRI constituant ainsi pBIOS203.

b) Construction du plasmide pBIOS208 portant le gène AMS.

Le fragment EcoRI du vecteur pBGS phléo contenant 399 paires de bases de l'extrémité 5' de l'élément Ac (Cocherel et al., 1996) a été cloné dans pBSsk (Stratagene) au site EcoRI, constituant ainsi pBIOS204.

Le fragment EcoRI - HindIII (comprenant l'extrémité 3' de Ac et la cassette NPTII) de pBIOS203 a été cloné dans pBSsk aux sites EcoRI - HindIII constituant ainsi pBIOS205.

Le fragment SmaI de pBIOS204 (comprenant l'extrémité 5' de Ac) a été cloné dans pBIOS205 au site SmaI constituant ainsi pBIOS206.

Le fragment SphI de DW 80 bin PR-glucanase contenant le gène PR-glucanase (PR-Glu) sous promoteur A9 et terminateur CaMV (Worall et al., 1992) a été cloné au site EcoRI de pBIOS206. Dans le plasmide résultant pBIOS208, le gène A9-PR-glucanase est inséré dans le sens inverse au gène NPTII.

c) Insertion de l'élément Ds::Kana^R-AMS dans un vecteur binaire.

Le vecteur pGA 492DL a été obtenu après les modifications suivantes de pGA 492 (G. An) :

5 - délétion du fragment SacII-ClaI correspondant à la cassette d'expression du gène chimérique NPTII. Ce nouveau vecteur est appelé pGa 492D ;

 - remplacement du fragment BglII-ScaI (perte d'une partie du gène CAT) de pGA 492D par le polylinker SacI-KpnI de pBSIIsk. Ce
10 nouveau vecteur s'appelle pGA 492 DL.

Le fragment HindIII-SpeI de pBIOS208 a été cloné aux sites HindIII-SpeI de pGA 492 DL pour constituer le plasmide binaire pBIOS232. La structure de cet ADN-T est schématisée dans les figures 1 et 2.

15

EXEMPLE 7

Transformation et sélection de la tomate

20 **a) Transformation de tomate (variété UC82B) par le vecteur binaire construit.**

Le vecteur binaire pBIOS232 a été transféré dans la souche d'*Agrobacterium* LBA 4404, par conjugaison triparentale selon la technique décrite par Ditta et al..

25 La transformation de la tomate a été effectuée selon la technique modifiée de J. Fillatti :

Des graines du cultivar UC82B sont stérilisées 15 minutes dans 10 % de Domestos, et rincées trois fois dans de l'eau stérile.

Elles sont ensuite semées en pot contenant du milieu de culture MSSV/2 pendant sept ou huit jours.

Les cotylédons sont prélevés et découpés transversalement en trois parties. Seule la partie centrale est conservée et mise en culture à 26°C et à la lumière, sur milieu KCMS additionné d'Acétosyringone, face inférieure contre le milieu.

Des bactéries de la souche *Agrobacterium* LBA 4404 sont mises en culture une nuit dans du milieu LB supplémenté avec l'agent sélectif approprié (tétracycline). Le lendemain, la culture est centrifugée et le culot obtenu est repris dans du milieu KCMS liquide.

Les explants sont trempés 30 minutes environ dans une solution d'*Agrobacterium* diluée au 1/20 dans du milieu KCMS additionné d'Acétosyringone. Ils sont ensuite séchés rapidement sur papier filtre.

Les explants sont ensuite :

- remis sur le même milieu KCMS pendant deux jours à l'obscurité à 26°C ;

- lavés dans du milieu liquide 2Z additionné d'Augmentin (400 mg/l) et séchés sur papier filtre ;

- transférés sur milieu solide 2Z contenant 400 mg/l d'Augmentin et 100 mg/l de Kanamycine ;
cultivés à la lumière à 26°C ; et

- repiqués sur du milieu 2Z frais, quinze jours après.

Trois semaines après la coculture, les premiers bourgeons apparaissent. Lorsqu'ils atteignent environ 1 cm, ils sont séparés de l'explant et repiqués sur milieu Dev où ils s'enracinent en une ou deux semaines s'ils sont bien transformés.

Quand ils sont bien enracinés, ils sont repiqués en motte Jiffy-7 (par AS Jiffy Products) au phytotron, où ils s'acclimatent rapidement.

5 Dès que le système racinaire est bien développé en "Jiffy", les plantes sont repiquées en pot de 12 cm de diamètre puis en container de 30 cm de diamètre, et cultivées en serre, sous arrosage automatique et solution nutritive (solution diluée à 5 kg/50 l délivrée à 1,6 %).

10 **b) Analyse moléculaire des transformants primaires**
contenant l'ADN-T de pBIOS144 ou pBIOS232.

Quand les plantes transformées sont assez développées en serre, des feuilles sont prélevées (environ 5 g) pour en extraire l'ADN analysé ensuite par Southern Blot selon les méthodes couramment utilisées (Sambrook et al.).

15 L'ADN de chaque plante est digéré avec l'enzyme HindIII. Après migration et transfert sur membrane de nitrocellulose, ceux-ci sont soumis à des hybridations avec différentes sondes permettant de vérifier :

- le nombre de copies de l'ADN-T insérées,
- si l'ADN-T a été inséré dans son intégralité,
- 20 - la présence ou l'absence d'extrabordures.

Au terme de ces analyses moléculaires, on sélectionne uniquement les plantes comportant un ADN-T entier unique sans extrabordure.

25 Le même protocole a été mise en oeuvre pour transformer des cellules de tomate avec le plasmide pBIOS144 et sélectionner les plantes transformées.

EXEMPLE 8

Evaluation de la source de transposase fixée

5

Une fois la source de transposase fixée et intégrée dans les plantes, on a vérifié qu'elle était capable d'activer un élément "Ds". Pour cela, les plantes ayant le plasmide pBIOS144 sélectionnées sont croisées avec une plante contenant un élément Ds testeur dont l'excision restaure l'activité du gène Gus (β -glucuronidase). Ce Ds a été construit en deux étapes:

10

- le fragment BglII-SpeI de pBIOS206 correspondant au Ds::Kana^R a été inséré aux sites BamHI-XbaI de pBI221 (Clontech) pour obtenir pBIOS226.

15

On a ensuite inséré le plasmide pBIOS226 entier au site HindIII dans pGA 492 DL. Le plasmide binaire résultant pBIOS228 comporte entre les bordures droite et gauche le Ds::Kana^R entre le promoteur 35S et la partie codante du gène Gus.

20

Toute excision de ce Ds::Kana^R se traduira par une expression du gène rapporteur Gus. Un test Gus (Jefferson et al.) est réalisé sur les descendants F1 de ce type de croisement pour évaluer l'efficacité des différentes lignées contenant la transposase. Des taches bleues ont été détectées sur des cotylédons et des secteurs sur des feuilles de plantes issues de croisement entre une lignée "transposase" et une lignée "Ds testeur". Le nombre de taches et secteurs sur une plante atteste de l'efficacité de la source de transposase dans cette plante.

25

EXEMPLE 9

Génération de lignées de transposase fixée

5 Les transformants unicopie et sans extrabordure sélectionnés et évalués positivement selon l'exemple précédent ont été soumis à deux cycles successifs d'autofécondation. Les lots de graines T2 ont été récoltés séparément.

10 Pour chaque T2, on a évalué la ségrégation pour la résistance à la kanamycine afin de détecter les lots de graines homozygotes. Pour chaque lot, une trentaine de graines sont semées en terre en serre. Dix-huit jours après le semis, une solution à 400 mg/l de kanamycine est pulvérisée sur les plantules pendant trois jours. (Weide et al.,). Cinq jours après, il est aisé d'identifier les plantes sensibles à la
15 kanamycine. D'après la ségrégation des plantes résistantes et sensibles, et conformément à la ségrégation Mendelienne d'un gène dominant, on identifie les lots de plantes homozygotes pour le transgène. Ce sont ceux-la que l'on garde préférentiellement et qui serviront à croiser les plantes contenant l'élément Ds::Kana^R -AMS.

20

EXEMPLE 10

Croisement des lignées Ds::Kana^R -AMS avec des lignées "transposase" homozygotes

25

Les transformants primaires sélectionnés (unicopie sans extrabordure) sont évalués dès leur floraison en serre, pour la fertilité par

observation microscopique de coupe transversale du tube d'anthere de une ou deux fleurs par plante, dans du carmin acétique. A l'issue de cette évaluation, seules les plantes mâles stériles qui ne présentent pas de pollen sont conservées.

5 Les plantes stériles portant le Ds::Kana^R - AMS sont fécondées avec du pollen de lignées exprimant la transposase d'Ac. Les fruits sont récoltés et les graines extraites.

10

EXEMPLE 11

A - Identification d'événement d'excision sur les plantes F1

15

Les graines issues de croisement entre les plantes portant la source de transposase et celles portant le Ds::Kana^R -AMS sont semées en terreau en serre. Au stade cotylédons, un cotylédon par plantule est prélevé en vue d'une extraction rapide d'ADN (Lassner et al., 1989) pour un test PCR avec les oligonucléotides A9a et A9b (fig. 1). Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes :

20

ADN : 40 ng (ou 10 µl de la microextraction)

oligo A9a (10 pM/µl) : 3 µl

oligo A9b (10 pM/µl) : 3 µl

Tampon x 10 : 10 µl

Mix dNTP (5 mM) : 4 µl

25

Taq Promega : 0,4 µl

MgCl₂ 25 mM : 8 µl

H₂O up qsp 100 µl

Les réactions sont effectuées dans la machine Perkin 9600.

Après 2 minutes de dénaturation à 95°C, on réalise 40 cycles des opérations suivantes :

30" de dénaturation à 94°C

5 30" d'hybridation à 55°C

1'30" d'élongation à 72°C

Le but de ce test est d'identifier rapidement les plantes porteuses du gène AMS (bande à 800 paires de bases en PCR) de celle qui ne le portent pas (pas de bande en PCR). Les plantes porteuses du gène AMS sont repotées et pendant leur floraison, on surveille l'apparition de fruits qui révéleraient un ou des secteurs d'excision somatique. L'observation de fruits sur des plantes F1 révèle soit une excision sans réinsertion du Ds soit une excision suivie d'une réinsertion avec perte d'activité.

15 Pour vérifier cela, les graines issues de ces fruits sont extraites et semées. Une analyse moléculaire par PCR de ces plantes est réalisée pour vérifier qu'elles ne portent plus le Ds::Kana^R-AMS, mais qu'elles possèdent la "cicatrice" de l'ADN-T et/ou le gène d'intérêt. Pour cela, un cotylédon de chaque plantule est prélevé pour extraction rapide d'ADN.

20 Un aliquot de cet ADN est prélevé pour être soumis à deux réactions PCR :

- l'une avec les oligonucléotides EM1 et EM5 (fig. 2),

Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes :

25 ADN : 40 ng (ou 10 µl de la microextraction)

oligo EM1 (10 pM/µl) : 3 µl

oligo EM5 (10 pM/µl) : 3 µl

Tampon x 10 : 10 μ l
Mix dNTP (5 mM) : 4 μ l
Taq Promega : 0,4 μ l
MgCl₂ 25 mM : 18 μ l
BSA : 8 μ l
Glycérol : 2,5 μ l
H₂O up qsp 100 μ l

Les réactions sont effectuées dans la machine Perkin 9600.

Après 2 minutes de dénaturation à 95°C, on réalise 40

cycles des opérations suivantes :

30" de dénaturation à 94°C

30" d'hybridation à 62°C

45" d'élongation à 72°C

Ce test permet de voir si la plantule est porteuse de la cicatrice de l'ADN-T et/ou du gène d'intérêt. Dans le cas où l'élément Ds est excisé, on attend un fragment de 300 paires de bases environ, pour la cicatrice seule, auquel il faut rajouter la taille du gène d'intérêt ;

- l'autre avec les oligonucléotides 5'H et Ac12 (fig. 3).

Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes :

ADN : 40 ng (ou 10 μ l de la microextraction)

oligo 5'H (10 pM/ μ l) : 3 μ l

oligo Ac12 (10 pM/ μ l) : 3 μ l

Tampon x 10 : 10 μ l

Mix dNTP (5 mM) : 4 μ l

Taq Promega : 0,4 μ l

MgCl₂ 25 mM : 18 μ l

BSA x 100 : 8 µl

Glycérol : 2,5 µl

H₂O up qsp 100 µl

Les réactions sont effectuées dans la machine Perkin 9600.

5 Après 2 minutes de dénaturation à 95°C, on réalise 40 cycles des opérations suivantes :

30" de dénaturation à 94°C

30" d'hybridation à 62°C

1'30" d'élongation à 72°C

10 Ce test permet de vérifier l'absence du gène codant pour la transposase. S'il n'y a pas de fragment amplifié, la transposase est absente. Si elle est présente, on détecte une bande de 1,6 Kb.

15 Les plantes issues d'événements d'excision ne portant plus que le gène d'intérêt sans la résistance à la kanamycine ni l'ADN-T portant le gène codant pour la transposase seront positives avec le premier jeu d'oligonucléotides (EM1-EM5) et négatives avec le deuxième (5'H-Ac12).

20 Une analyse Southern réalisée sur ces plantes permet de confirmer la présence du gène d'intérêt et l'absence du gène de résistance à la kanamycine.

B - Identification de transformants dépourvus du marqueur sélectif

25 **1) Matériels**

Sonde NPTII :

Amplification d'un fragment de 1 KB du gène NPTII du vecteur pBios232 avec les oligonucléotides Kana7 et Kana8, de séquences.

Kana 7 : gctcgacgtgtgactgaag
Kana 8 : cccggaaaacgattccgaag

Le gène NPTII utilisé a été isolé à partir du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* (Berg et Berg, 1983).

Sondes Cat intraLB +intra RB :

Mélange de 2 sondes :

Cat int LB : fragment Sall de l'ADN-T de pGA 492 DL contenant la bordure gauche et une partie du gène Cat

Int RB ; fragment Sall de l'ADN-T de pGA 492 contenant la bordure droite

L'ensemble des 2 sondes correspond à l'ensemble de l'ADN-T de pGA 492 DL qui est le vecteur de base ayant servi à la construction de pBios 232 ayant servi à créer les plantes Ds : :Kana^R-AMS.

2) Identification et culture des plantes à deux composants actifs :

Des graines F1 issues de croisement entre une plante portant le Ds : :Kana^R-AMS et une plante portant la source de transposase fixée ont été obtenue et semées. Un test PCR sur de l'ADN de cotylédons de 173 plantes a été fait avec les oligonucléotides EM1 et EM5 comme décrit plus haut. Ce test a permis d'identifier 18 plantes où une bande de 350 pb a été amplifiée par EM1-EM5, révélant ainsi des

événements d'excision somatiques, attestant la présence et la fonctionnalité des 2 éléments du système.

Le système a été mis au point avec un ADN-T portant un Ds : :Kana^R- AMS mais pas de gène d'intérêt. De ce fait la bande d'excision révélée par une amplification faite avec EM1 et EM5 est
5 d'environ 350 pb. Dans le cas où un gène d'intérêt est inséré, cette bande sera allongée de la taille de ce gène. Selon un autre mode de réalisation, on peut également utiliser des oligonucléotides spécifiques du gène d'intérêt.

10 Ces 18 plantes ont été cultivées en champ pendant 4 mois . L'observation des fleurs est faite régulièrement pour vérifier la fertilité des anthères, ainsi que l'apparition de fruits. Pour 3 de ces 18 plantes des fruits sont apparus sur certains bouquets seulement. Ces plantes étaient donc chimériques pour les phénotypes mâle stérile /mâle fertile.
15 Les fruits sur ces plantes ont été récoltés bouquet par bouquet en notant la hiérarchie du bouquet par rapport à la plante entière.

Des graines de fruits apparus sur 3 bouquets des 3 plantes redevenues partiellement fertiles ont été semées. Des feuilles des plantules obtenues (4 plantules / bouquet), ont été prélevées en vue
20 d'une extraction d'ADN pour une analyse de type Southern. L'ADN est soumis à une digestion avec l'enzyme Hind III (site unique dans l'ADN-T), avant d'être soumis à une électrophorèse et un transfert sur membrane. Les 36 échantillons correspondant aux descendants F2 ont été traités en même temps que de l'ADN des parents de l'hybride (la plante portant le
25 Ds : :Kana^R-AMS et la plante portant la source de transposase fixée), de manière à avoir les profils de référence. L'hybridation du Southern blot avec les sondes NPTII et Cat-int LB a permis d'identifier des plantes qui

ne portaient plus l'ADN-T contenant la source de transposase ni le Ds : :Kana^R-AMS mais qui contenaient bien la cicatrice de l'ADN-T, grâce à la comparaison avec le profil des parents..

5 Nous avons analysé au total 36 plantes, sans sélection préalable à la kanamycine, provenant de 3 bouquets des 3 plantes où des fruits ont été observés.

3) Bilan de l'analyse :

10 20 plantes portant l'ADN-T « cicatrisé » c'est à dire révélant 1 bande hybridant avec la sonde Cat int LB-RB, de taille inférieure à celle présente dans le parent portant le Ds. Cette même bande n'est pas hybridée par la sonde NPTII.

15 31 plantes portant la source de transposase, c'est à dire révélant une bande hybridant avec la sonde NPTII de taille identique à celle révélée par la même sonde chez le parent portant la source de transposase fixée.

5 plantes portant l'ADN-T vide mais ne portant pas la source de transposase.

20 Sur 36 plantes analysées, 5 se sont avérées être des transformants propres ne portant plus que l'ADN-T porteur du gène d'intérêt, et ayant excisé le gène marqueur de sélection.

Il est donc possible de sélectionner des plantes transformées propres 2 générations après le transformant primaire.

25 Les avantages de cette technique sont multiples. Elle permet d'identifier de manière précoce les transformants dépourvus de marqueur sélectif.

Le croisement du transformant primaire avec la source de transposase est facilité et plus fiable puisque celui ci est mâle stérile.

Cette technique permet enfin le criblage d'un faible nombre de plantules pour identifier des transformants propres : sans présélection préalable, après analyse de 36 descendants de 3 plantes, il a été
5 identifié 5 plantes contenant l'ADN-T dépourvu du Ds : :Kana^R- AMS.

Par ailleurs, il est possible d'améliorer l'identification des transformants dépourvus de marqueurs :

si on traite préalablement à la Kanamycine les descendants
10 des fruits produits sur une plante portant le Ds : :Kana^R- AMS et la source de transposase, on doit avoir un quart de plantes Kana^S au lieu de 15/16 (normalement obtenus s'il n'y avait pas excision du Ds). Parmi ceux-ci, $\frac{3}{4}$ sont porteurs de l'ADN-T « propre », l'autre quart correspondant aux ségrégants classiques qui ne portent aucun
15 transgène. L'observation d'une ségrégation $\frac{3}{4}$ de plantes résistantes pour $\frac{1}{4}$ de sensibles permet en outre de confirmer rapidement que le système d'élimination a été efficace.

Il est donc possible d'identifier des descendants propres en analysant très peu de plantes parmi les plantules F2 sensibles à la
20 Kanamycine.

4) Conclusion :

Cette étude montre que l'adjonction d'un gène conférant la
25 stérilité mâle artificielle au système d'élimination de gène marqueur par Ac / Ds, permet d'identifier rapidement les descendants portant le gène d'intérêt sans le marqueur sélectif, tout en facilitant le processus et en

prévenant la dissémination par le pollen d'événements transgéniques insuffisamment caractérisés.

EXEMPLE 12

5 **Construction d'un plasmide binaire pBIOC4-FLP portant la recombinaise FLP.**

La séquence codant la recombinaise FLP de *Saccharomyces cerevisiae* est contenue dans pOG44 commercialisé par Stratagene. Le
10 plasmide pOG44 a été digéré par les enzymes HindIII et KpnI et le fragment HindIII-KpnI a été isolé. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur pBIOS512 déphosphorylé et 50 ng de fragment HindIII-KpnI portant la séquence codant la recombinaise dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et
15 de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées. Le plasmide résultant est appelé pBIOS512-FLP. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 50 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la méthode de
20 la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le fragment portant la séquence codant la recombinaise FLP a été isolé par digestion enzymatique par KpnI suivi de l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant puis de la digestion par HindIII. Le fragment a été purifié par
25 électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, précipité à l'alcool et séché. Il a été introduit au site BamHI, traité par l'enzyme Klenow (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant, et au site

HindIII du plasmide pBIOS512. La séquence nucléotidique de FLP a été vérifiée par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). Le plasmide pBIOS512 dérive de pUC et porte la cassette d'expression "promoteur double 35S (PD35S) - terminateur NOS (TNOS)" (fragment EcoRI). Le promoteur double 35S provient de pJIT163 (WO 96 33277).

A partir de pBIOS512-FLP, le fragment EcoRI portant la cassette d'expression "PD35S-FLP-TNOS" a été isolé par digestion enzymatique par EcoRI, purifié sur gel d'agarose à 0,8%, électroélué, précipité à l'alcool et séché. Il a été introduit au site EcoRI de pBIOC4 (WO 96 33277) déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur déphosphorylé et 50 ng de fragments portant la cassette "PD35S-FLP-TNOS" dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées. Le plasmide résultant est appelé pBIOC4-FLP. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu contenant 12 µg/ml de tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. L'ADN plasmidique du plasmide binaire pBIOC4-FLP a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters et al. (1978). La validité du clone retenu a été vérifiée par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique introduit.

EXEMPLE 13

Construction d'un plasmide binaire et pBIOC511, portant la stérilité mâle et la sélection sur kanamycine entre des sites de recombinaison spécifique FRT, utilisable en transgénèse du tabac.

Le plasmide binaire pGA492 (An, 1986) a été délété des séquences suivantes : le promoteur constitutif du gène nos codant pour la nopaline synthase (Depicker et al., 1982), la séquence codante du gène nptII codant pour la néomycine phosphotransférase II (Berg et Berg, 1983) délétée de la région des 8 premiers codons dont le codon initiateur méthionine ATG et fusionnée à la séquence des 14 premiers codons de la séquence codante du gène nos (Depicker et al., 1982), la séquence codante du gène nos dépourvue de la région des 14 premiers codons, le terminateur nos (Depicker et al., 1982). Cette délétion a été réalisée par digestion totale ClaI, suivie d'une digestion partielle SacII. Le fragment est purifié, puis soumis à l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. La ligation du plasmide et la transformation de bactéries *Escherichia coli* DH5 α rendues préalablement compétentes, sont réalisées en suivant les procédés usuels (Sambrook et al., 1989). Le plasmide résultant est appelé pBIOC506.

Le site d'intégration spécifique FRT a été amplifié par PCR à partir du plasmide pOG45 commercialisé par Strategene. Les deux oligodésoxynucléotides utilisés comme amorces pour la PCR sont :
5' CCC CTG CAG TTT TCA AAA GCG CTC TGA AGT TC 3' et

5' CCA AAG CTT GAA TTC GCC AGG GGG ATC TTG AAG TTC 3'.

Les fragments correspondants au site FRT, issus de l'amplification PCR ont été digérés par PstI, soumis à l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant, puis digérés par EcoRI. Ils ont été purifiés sur gel d'agarose à 2 %, électroélués, précipités à l'alcool, séchés et repris dans de l'eau. Puis ils ont été ligués entre le site SacI préalablement soumis à l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase et le site EcoRI du plasmide pUC18 commercialisé par Pharmacia. Le plasmide résultant est appelé pBIOC507.

Un deuxième site FRT a été introduit dans le plasmide pBIOC507. Ce deuxième site FRT résulte de l'amplification PCR à l'aide des deux oligodésoxynucléotides :

5' CCC CTG CAG TTT TCA AAA GCG CTC TGA AGT TC 3' et
5' AAA GGT ACC GCC AGG GGG ATC TTG AAG TTC 3'.

Les fragments amplifiés ont digérés par PstI et KpnI, soumis à l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase, et ligués au site SphI préalablement traité par l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase, du plasmide pBIOC507. Le plasmide résultant est appelé pBIOC508 et contient les deux sites FRT orientés dans le même sens.

A partir du plasmide pBIOC508, le fragment HindIII - EcoRI portant les deux sites FRT, a été isolé. Ce fragment a été inséré aux sites HindIII et EcoRI du plasmide pBIOC506. Le plasmide résultant est appelé pBIOC509.

Pour conférer la stérilité mâle, le fragment SphI portant le gène chimérique correspondant à "promoteur A9 - barnase -T35S" contenu dans pWP173 (Paul et al., 1992) a été utilisé. Ce fragment SphI

a été traité par l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase et ligué au site PstI traité par l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase du plasmide pBIOC509. Le plasmide résultant est appelé pBIOC510.

Enfin, pour permettre la sélection sur kanamycine (Fromm et
5 al., 1986), le fragment EcoRI traité par l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase, correspondant à la cassette d'expression "PNOS - nptII - TNOS" isolée à partir d'un plasmide de pBIOS1 dans lequel a été cloné au site BamH1 le fragment BamH1 codant pour le gène nptII, a été ligué
10 au site KpnI traité par l'action de l'enzyme T4 DNA Polymérase du plasmide pBIOC510. Le plasmide résultant est appelé pBIOC511.

MILIEUX DE CULTURE

LB

- 10 g/l Bactotryptone
- 5 g/l extrait de levure
- 5 10 g/l NaCl
- pH 7,5 ajusté avec NaOH

MSSV/2

- 10 2,2 g macro et micro-éléments de Murashige et Skoog (ref. M 6899 Sigma)
- 2 ml/l vitamines de Nitsch
- 15 g/l saccharose
- 8 g/l Agar-Agar
- 15 pH 5,9 avant autoclavage

2Z

- 20 4,4 g macro et micro-éléments de Murashige et Skoog (ref. M 6899 Sigma)
- 2 ml/l vitamines de Nitsch
- 30 g/l saccharose
- 2 mg/l Zéatine
- 400 mg/l Augmentin
- 25 100 mg/l Kanamycine
- 8 g/l Agar-Agar
- pH 5,9 avant autoclavage

KCMS

4,4 g macro et micro-éléments de Murashige et Skoog (ref. M 6899
Sigma)

- 5 0,9 mg/l Thiamine
200 mg/l potassium dihydrogénophosphate
30 g/l saccharose
8 g/l Agar-Agar
200 µM Acétosyringone
10 0,2 mg/l 2-4D
0,1 mg/l Kinétine
pH 5,9 avant autoclavage

15 DEV

2,2 g macro et micro-éléments de Murashige et Skoog (ref. M 6899
Sigma)

- 2 ml/l vitamines de Nitsch
15 g/l saccharose
20 50 mg/l Kanamycine
400 mg/l Augmentin
8 g/l Agar-Agar
pH 5,9 avant autoclavage

25

MS20

4,4 g/l M0404 (SIGMA)

20 g/l Saccharose

8 g/l Agar-Agar (milieu solide)

5 pH 5,7

+ éventuellement hormones végétales BAP 1 mg/l et ANA 0,1 mg/l

10 MS30

4,4 g/l M0404 (SIGMA)

30 g/l Saccharose

8 g/l Agar-Agar (milieu solide)

pH 5,7

15 + éventuellement hormones végétales BAP 1 mg/l et ANA 0,1 mg/l

BIBLIOGRAPHIE

- An G.(1986), Plant Physiol. 81 : 86-91
- 5 - Bednarek S.Y et Ralkhel N.V., The Plant Cell, 3, 1195-1206 (1991)
- Broer et al., Braunschweig Symposium on Applied Plant Molecular
biology, Braunschweig November 21-23, (1988) ; Proceedings,Ed. Galling
G., (1989), 240
- 10 - Berg D.E., Berg C.M., (1983) Biotechnology, 1, 417-435
- Close J.J., Rodriguez R.L., (1982) Gene, 20, 305-316
- 15 - Cocherel S., Perez P., Degroote F., Genestier S., Picard G., (1996),
Plant Molecular Biology 30 : 539-551
- De la Penna (1987), Nature, 325:274-278
- 20 - Depicker et al., (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573
- Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D.R., (1980) Pnas 77 : 7347-
7351
- 25 - Ellstrand Norman C., (1990), Bioscience, vol.40 n° 6, pp 438-442

- Fillatti J.J., Kiser J., Rose R. et Commaï L., (1987) Bio/Technology 5 : 726-730
- Finnegan E.J., Lawrence G.J., Dennis E.S., Ellis J.G., (1993) Plant
5 Molecular Biology 22 : 625-633
- Franck et al., (1980) Cell. 21,285-294
- Fromm M.E., Taylor L.P., Walbot V., (1986) Nature, vol. 319, 791-793
- 10 - Gaubier et al., Mol. Gen., 238, 409-418 (1993)
- Holsters et al., (1978) Mol. Gen., Genet., 163, 181-187
- 15 - Horsch et al., (1985), Science, 227, 1229 (1985)
- Jefferson R.A., (1987) Plant Molecular Biology, Rep. 5 : 387-405
- Jouanin, Plant. Sci., 53, 53-63 (1987)
- 20 - Kay, Science, (1987) 236, 1299-1302
- Lassner M.W., Peterson P., Yoder J.I., (1989), Plant Molecular Biology
Rep. 7 : 116-128
- 25 - Liu, (1951) Mol. Plant. Microb., Interactions, 6, 144-156

- Matsuoka K., Nakamura K., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 834-838
- Mc Elroy (1991) Mol. Gen. Genet. 231 : 150-160
- 5 - Murakami et al., Plant Mol. Biol., (1986) 7, 343-355
- Ni et al., Plant J., (1995) 7, 661-676
- 10 - Paul W. et al. (1992) Plant. Mol. Biol. 19 : 611-622
- Perez P., Tiraby G., Kallerhoff J., Perret J., (1989), Plant Molecular Biology 13 : 365-373
- 15 - Rogers S., Bendich A.J., (1988), Plant Molecular Biology, Manual A65, 69-76
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor laboratory press
- 20 - Sanford J.C., (1988) Trends in Biotechnology, 6, 299-302
- Schroeder M.R., Borkhsenius O.N, Matsuoka K., Nakamura K. et Rakheh N.V., (1993) Plant. Physiol., 101, 451-458
- 25 - Watson et al., ADN recombinant, Ed. De Boeck Université, p 273-292

- Weider R., Koornneef M., Zabel P., (1989) Theo. Appl. Gen., 78 : 169-172

-- Worall D. Hird D.L., Hodge R., Paul W., Draper J., and Scott R., (1992),
Plant Cell 4, 759-771

5

- Yoder J.I. Goldsbrough A.P., (1994), Bio/Technology vol. 12, 263-267

REVENDICATIONS

5 1. Utilisation d'une plante mâle stérile pour éviter la dissémination d'un transgène d'intérêt intégré dans le génome de ladite plante.

2. Utilisation selon la revendication 1 dans laquelle ladite plante est porteuse d'une stérilité mâle cytoplasmique.

10

3. Utilisation selon la revendication 1 dans laquelle ladite plante est porteuse d'une stérilité mâle nucléaire.

15 4. Utilisation d'un gène AMS excisable comme moyen permettant le criblage de plantes transformées génétiquement ayant intégré un transgène d'intérêt et éliminé un fragment d'ADN excisable, ledit fragment d'ADN excisable pouvant :

- soit être ledit gène AMS lui-même,
- soit contenir le gène AMS lié génétiquement à un fragment
20 d'ADN indésirable, de telle sorte que ledit gène AMS et ledit fragment d'ADN indésirable puissent être excisés simultanément, ledit fragment d'ADN indésirable étant de préférence un gène marqueur, de préférence un gène conférant une résistance à un antibiotique.

25 5 Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite plante est choisie parmi le maïs, colza, le tabac ou la tomate.

6. Plante transgénique, partie ou extrait de plante transgénique, caractérisée en ce que ledit transgène d'intérêt est lié génétiquement à un gène AMS associé à des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un
5 terminateur de transcription.

7. Vecteur, notamment plasmide, caractérisé en ce qu'il contient un transgène d'intérêt associé à des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un
10 terminateur de transcription, lié génétiquement à un gène AMS associé à des éléments permettant son expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.

8. Hôte cellulaire, notamment bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur selon la revendication 7.
15

9. Procédé d'insertion d'un gène AMS dans une plante caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon la revendication 8, lui-même transformé par un vecteur selon la revendication 7, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules un gène AMS lié génétiquement à un transgène d'intérêt.
20

25

10. Procédé d'élimination d'un fragment d'ADN excisable, caractérisé en ce qu'il comprend :

- soit

a) la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon la revendication 8, lui-même transformé par un vecteur selon la revendication 7 comprenant un gène AMS excisable, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules ledit gène AMS, excisable par recombinaison ou transposition ;

b) la régénération de plantes transformées à partir des cellules végétales transformées sus-mentionnées ;

c) la transformation de cellules végétales de manière à intégrer dans le génome de ces cellules un élément inducteur de transposition ou de recombinaison ;

d) la régénération de plantes transformées à partir des cellules végétales transformées mentionnées à l'étape c) ;

e) le croisement des plantes mâles stériles obtenues à l'étape b) avec les lignées exprimant la transposase ou la recombinase obtenues à l'étape d), des événements d'excision se produisant chez les plantes F1.

- soit

a') la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon la revendication 8, lui-même transformé par un vecteur selon la revendication 7 comprenant un gène AMS excisable, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules ledit gène AMS excisable par recombinaison ou transposition ;

b') la régénération de plantes transformées à partir des cellules végétales transformées sus-mentionnées ;

c') la transformation des cellules végétales issues des plantes transformées sus-mentionnées de manière à intégrer dans le

génom de ces cellules un élément inducteur de transposition ou de recombinaison;

d') la régénération de plantes transformées à partir des cellules végétales transformées mentionnées à l'étape c').

5

11. Procédé de production d'un produit d'expression d'un transgène d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend :

a) - soit la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon la revendication 8, lui-même transformé par un vecteur selon la revendication 7, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules un gène AMS lié génétiquement à un transgène d'intérêt ;

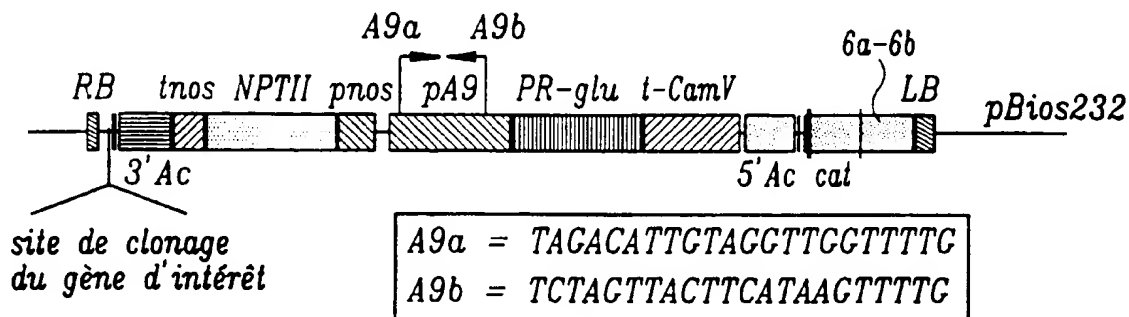
- soit la transformation de cellules végétales porteuses d'une stérilité mâle cytoplasmique ou nucléaire de manière à intégrer un transgène d'intérêt dans le génome de ces cellules ;

b) la régénération de plantes transformées à partir des cellules végétales transformées sus-mentionnées ;

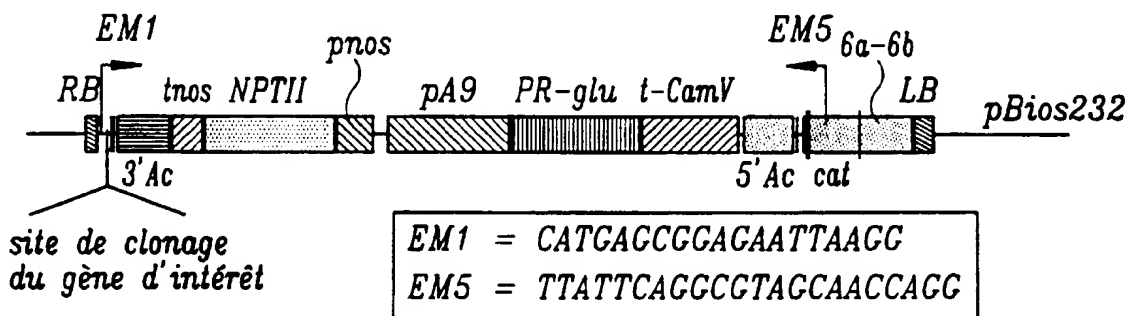
c) la récupération du produit d'expression dudit transgène d'intérêt dans lesdites cellules ou plantes transformées sus-mentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

12. Kit pour la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il contient d'une part un vecteur selon la revendication 7 comprenant un gène AMS excisable, ou une plante ou partie de plante transformée par ledit vecteur, et d'autre part un vecteur portant une source de transposase ou de recombinaise, ou une plante ou partie de plante transformée par ledit vecteur.

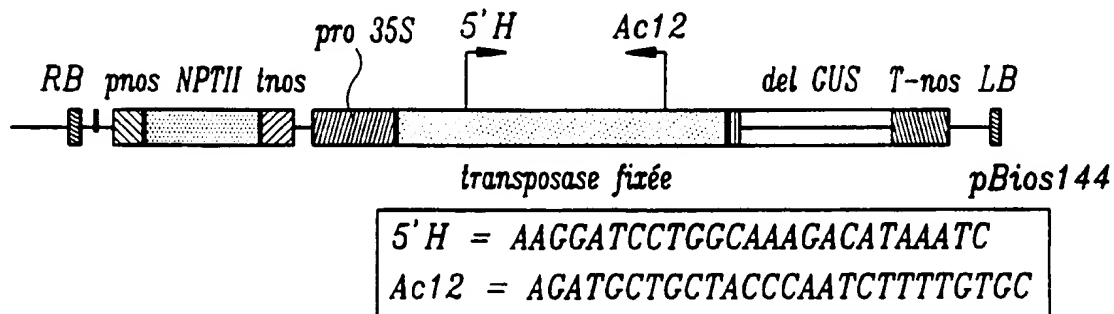
1/1



Localisation des oligonucléotides A9a et A9b

FIG.1

Localisation des oligonucléotides EM1 et EM5

FIG.2

Localisation des oligonucléotides 5'H et Ac12

FIG.3



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|--|
| <p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/82, 15/12, 1/21, A01H 5/00</p> | <p>A3</p> | <p>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/38323 (43) Date de publication internationale: 3 septembre 1998 (03.09.98)</p> |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00381 (22) Date de dépôt international: 26 février 1998 (26.02.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/02369 27 février 1997 (27.02.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOCEM [FR/FR]; 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PEREZ, Pascual [FR/FR]; Chemin de la Pradelle, Varennes, F-63450 Chanonat (FR). FLAMENT, Pascal [FR/FR]; 7, impasse du Moulin, F-63118 Cebazat (FR). (74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).</p> | | <p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 17 décembre 1998 (17.12.98)</p> |
| <p>(54) Title: NOVEL USES OF MALE STERILITY IN PLANTS (54) Titre: NOUVELLES UTILISATIONS DE LA STÉRILITÉ MÂLE CHEZ LES PLANTES (57) Abstract The invention concerns novel uses of male sterility to improve the cultivation conditions of transgenic plants for man and environment. (57) Abrégé L'invention concerne de nouvelles utilisations de la stérilité mâle pour améliorer les conditions de culture des plantes transgéniques pour l'homme et l'environnement.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakhstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00381

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/12 C12N1/21 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No |
|----------|--|----------------------|
| X | WO 91 09957 A (DU PONT) 11 July 1991 cited in the application * The whole document , part. p. 19-20 1.31 * | 4,5 |
| X | ELLSTRAND N. AND HOFFMAN C.: "Hybridization as an avenue of escape for engineered genes" BIOSCIENCE, vol. 40, no. 6, June 1990, pages 438-442, XP002048569 cited in the application * p.440/441 * | 1-3,5,6 |
| X | WO 96 04393 A (DELTA & PINE LAND CO :US GOVERNMENT (US)) 15 February 1996 * The whole document , part. p. 9-14 * | 1-10,12 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 August 1998

Date of mailing of the international search report

26/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00381

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No |
|----------|---|----------------------|
| A | WO 93 01283 A (US) 21 January 1993 see the whole document --- | 4-12 |
| A | WO 96 15252 A (JUJO PAPER CO LTD ;EBINUMA HIROYASU (JP); SUGITA KOICHI (JP); MATS) 23 May 1996 see the whole document --- | 4-12 |
| A | WO 93 02197 A (NICKERSON BIOCEM LTD) 4 February 1993 see the whole document --- | 1-12 |
| A | WO 92 11379 A (NICKERSON INT SEED) 9 July 1992 cited in the application see the whole document ----- | 1-12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/FR 98/00381

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9109957 A | 11-07-1991 | AU 639059 B | 15-07-1993 |
| | | AU 6974791 A | 24-07-1991 |
| | | CA 2071943 A | 23-06-1991 |
| | | EP 0506763 A | 07-10-1992 |
| | | IL 96768 A | 10-06-1997 |
| | | US 5658772 A | 19-08-1997 |
| WO 9604393 A | 15-02-1996 | US 5723765 A | 03-03-1998 |
| | | AU 3205095 A | 04-03-1996 |
| | | BR 9508471 A | 28-10-1997 |
| | | CA 2196410 A | 15-02-1996 |
| | | EP 0775212 A | 28-05-1997 |
| | | JP 10503377 T | 31-03-1998 |
| | | ZA 9506410 A | 11-03-1996 |
| WO 9301283 A | 21-01-1993 | CA 2073412 A | 09-01-1993 |
| WO 9615252 A | 23-05-1996 | JP 9154580 A | 17-06-1997 |
| | | AU 3855795 A | 06-06-1996 |
| | | BG 101524 A | 30-01-1998 |
| | | BR 9509715 A | 28-10-1997 |
| | | CA 2162449 A | 10-05-1996 |
| | | CN 1137565 A | 11-12-1996 |
| | | CZ 9701388 A | 18-02-1998 |
| | | EP 0716147 A | 12-06-1996 |
| | | FI 971961 A | 07-07-1997 |
| | | HU 77074 A | 02-03-1998 |
| | | NO 972108 A | 07-07-1997 |
| | | PL 320201 A | 15-09-1997 |
| WO 9302197 A | 04-02-1993 | AU 686092 B | 05-02-1998 |
| | | AU 2361492 A | 23-02-1993 |
| | | CA 2114008 A | 04-02-1993 |
| | | CZ 9400139 A | 18-03-1998 |
| | | EP 0595981 A | 11-05-1994 |
| | | HU 69640 A | 28-09-1995 |
| | | JP 6509231 T | 20-10-1994 |
| | | SK 7494 A | 05-01-1995 |
| WO 9211379 A | 09-07-1992 | AU 654314 B | 03-11-1994 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00381

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9211379 A | | AU 9133791 A | 22-07-1992 |
| | | CA 2099125 A | 25-06-1992 |
| | | EP 0564513 A | 13-10-1993 |
| | | JP 6507065 T | 11-08-1994 |
| | | US 5723754 A | 03-03-1998 |
| ----- | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de internationale No

PCT/FR 98/00381

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/82 C12N15/12 C12N1/21 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no des revendications visées |
|-----------|--|------------------------------|
| X | WO 91 09957 A (DU PONT) 11 juillet 1991 cité dans la demande * le document en entier, part. p. 19-20 1.31 * | 4,5 |
| X | ELLSTRAND N. AND HOFFMAN C.: "Hybridization as an avenue of escape for engineered genes" BIOSCIENCE, vol. 40, no. 6, juin 1990, pages 438-442, XP002048569 cité dans la demande * p.440/441 * | 1-3,5,6 |
| X | WO 96 04393 A (DELTA & PINE LAND CO ;US GOVERNMENT (US)) 15 février 1996 * le document en entier, part. p. 9-14 * | 1-10,12 |
| | --- -/-- | |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 août 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/08/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Kania, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : de Internationale No

PCT/FR 98/00381

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Categorie | Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visees |
|-----------|---|-------------------------------|
| A | WO 93 01283 A (US) 21 janvier 1993 voir le document en entier --- | 4-12 |
| A | WO 96 15252 A (JUJO PAPER CO LTD ;EBINUMA HIROYASU (JP); SUGITA KOICHI (JP); MATS) 23 mai 1996 voir le document en entier --- | 4-12 |
| A | WO 93 02197 A (NICKERSON BIOCEM LTD) 4 février 1993 voir le document en entier --- | 1-12 |
| A | WO 92 11379 A (NICKERSON INT SEED) 9 juillet 1992 cité dans la demande voir le document en entier ----- | 1-12 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de internationale No

PCT/FR 98/00381

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 9109957 A | 11-07-1991 | AU 639059 B | 15-07-1993 |
| | | AU 6974791 A | 24-07-1991 |
| | | CA 2071943 A | 23-06-1991 |
| | | EP 0506763 A | 07-10-1992 |
| | | IL 96768 A | 10-06-1997 |
| | | US 5658772 A | 19-08-1997 |
| WO 9604393 A | 15-02-1996 | US 5723765 A | 03-03-1998 |
| | | AU 3205095 A | 04-03-1996 |
| | | BR 9508471 A | 28-10-1997 |
| | | CA 2196410 A | 15-02-1996 |
| | | EP 0775212 A | 28-05-1997 |
| | | JP 10503377 T | 31-03-1998 |
| | | ZA 9506410 A | 11-03-1996 |
| WO 9301283 A | 21-01-1993 | CA 2073412 A | 09-01-1993 |
| WO 9615252 A | 23-05-1996 | JP 9154580 A | 17-06-1997 |
| | | AU 3855795 A | 06-06-1996 |
| | | BG 101524 A | 30-01-1998 |
| | | BR 9509715 A | 28-10-1997 |
| | | CA 2162449 A | 10-05-1996 |
| | | CN 1137565 A | 11-12-1996 |
| | | CZ 9701388 A | 18-02-1998 |
| | | EP 0716147 A | 12-06-1996 |
| | | FI 971961 A | 07-07-1997 |
| | | HU 77074 A | 02-03-1998 |
| | | NO 972108 A | 07-07-1997 |
| | | PL 320201 A | 15-09-1997 |
| WO 9302197 A | 04-02-1993 | AU 686092 B | 05-02-1998 |
| | | AU 2361492 A | 23-02-1993 |
| | | CA 2114008 A | 04-02-1993 |
| | | CZ 9400139 A | 18-03-1998 |
| | | EP 0595981 A | 11-05-1994 |
| | | HU 69640 A | 28-09-1995 |
| | | JP 6509231 T | 20-10-1994 |
| | | SK 7494 A | 05-01-1995 |
| WO 9211379 A | 09-07-1992 | AU 654314 B | 03-11-1994 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 98/00381

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 9211379 A | | AU 9133791 A | 22-07-1992 |
| | | CA 2099125 A | 25-06-1992 |
| | | EP 0564513 A | 13-10-1993 |
| | | JP 6507065 T | 11-08-1994 |
| | | US 5723754 A | 03-03-1998 |
| ----- | | | |